

201522010B

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

非動物性の加工食品等における
病原微生物の汚染実態に関する研究

平成25 - 27年度 総合研究報告書

研究代表者 朝倉 宏
国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
平成28（2016）年3月

非動物性の加工食品等における
病原微生物の汚染実態に関する研究

研究代表者 朝倉 宏

平成 28 (2016) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告	
非動物性の加工食品等における病原微生物の汚染実態に関する研究 朝倉 宏	3
II. 分担総合研究報告ならびに委託研究報告	
1. 細菌・真菌汚染実態に関する研究	
浅漬けにおける細菌汚染実態と製造施設環境調査に関する研究 田口 真澄 他	33
市販浅漬けにおける細菌汚染実態と衛生指標菌に関する研究 朝倉 宏 他	57
浅漬け製造工程における微生物挙動に関する研究 朝倉 宏 他	69
国内における漬物の生産・流通実態に関する情報収集 朝倉 宏 他	77
漬物の衛生規範に関する実態調査—真菌調査— 高鳥 浩介 他	89
2. 寄生虫による汚染に関する研究 杉山 広 他	95
3. 容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス対策に関する研究 容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス対策に係る情報収集と食品内挙動に関する研究 廣井 豊子、百瀬 愛佳 他	107
4. 非動物性食品における食品汚染・食中毒発生等に関する情報調査研究 国外における非動物性食品の病原微生物汚染の実態とその対策に関する調査 窪田 邦宏、春日 文子 他	125
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	165

平成 25—27 年度 研究分担者・研究協力者

研究代表者

朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所

研究分担者

春日 文子 国立医薬品食品衛生研究所
窪田 邦宏 国立医薬品食品衛生研究所
杉山 広 国立感染症研究所
田口 真澄 大阪府立公衆衛生研究所
廣井 豊子 国立大学法人帯広畜産大学
百瀬 愛佳 国立医薬品食品衛生研究所

研究協力者

天沼 宏 国立医薬品食品衛生研究所
荒川京子 国立感染症研究所
五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所
生野 博 (株)ビー・エム・エル
太田利子 相模女子大学
荻原恵美子 国立医薬品食品衛生研究所
奥村香世 国立大学法人帯広畜産大学
賀川千里 国立感染症研究所
神吉政史 大阪府立公衆衛生研究所
倉園久生 国立大学法人帯広畜産大学
小西良子 麻布大学
酒井真由美 国立医薬品食品衛生研究所
柴田勝優 国立感染症研究所
須田貴之 日本食品分析センター
高鳥浩介 NPO 法人カビ相談センター
高鳥美奈子 NPO 法人カビ相談センター
高橋淳子 桐生大学
橘 理人 国立医薬品食品衛生研究所
田中詩乃 NPO 法人カビ相談センター
中村寛海 大阪市立環境科学研究所
林 賢一 (株)日吉
堀内朗子 日本食品衛生協会食品衛生研究所
牧野壮一 京都聖母女学院短期大学
榎田和彌 国立医薬品食品衛生研究所
村松芳多子 高崎健康福祉大学
森嶋康之 国立感染症研究所
山本詩織 国立医薬品食品衛生研究所
吉村昌徳 日本冷凍食品検査協会

(敬称略、五十音順)

I. 総合研究報告

平成25-27年度厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業
総合研究報告書

非動物性の加工食品等における病原微生物の汚染実態に関する研究

研究代表者 朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨：本研究は（1）病原微生物の汚染実態に関する研究、（2）容器包装詰低酸性食品のボツリヌス対策に関する研究、（3）食中毒や食品汚染実態等に関する情報収集より構成され、非動物性食品における病原微生物の汚染実態を把握すると共に当該食品に対して執るべき対策を議論する上での基礎知見の集積を図ることを目的として諸検討を行った。

微生物汚染実態に関する研究としては、浅漬の細菌汚染実態に関する検討の中で、同一製品から継続的にリステリア汚染を示す製品を見出した。同製品の製造施設において環境調査を自治体の協力を得て実施し、汚染箇所の特定並びに除去方法に関する改善指導を実施することで、最終製品での陰性化に成功した。これらの事例より得られた、留意すべき工程や除去方法等に関する情報について、今後同様の事例が発生した際に活用できるよう取り纏めた。また、衛生規範改正に伴う浅漬製造施設でのパイロットスタディを通じ、原材料の塩蔵及び次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌工程が、病原菌の低減に有効に機能することを実証した。更に、規範改正前後での市販浅漬製品を対象に指標菌定量及び構成菌叢の比較を行い、規範改正後の供試製品における衛生状況の改善実態を把握した。また、指標菌数と構成菌叢の動態より、浅漬等の非加熱生鮮野菜加工製品に対する衛生指標菌として大腸菌群は適切ではなく、大腸菌が望ましいと考えられた。更に、漬物製品における真菌・酵母の汚染実態を調査し、複数製品で現行の規範に定められる基準を満たすことが現実的に困難であること、何れも検出数よりも分離された微生物の同定が衛生管理の向上に重要な意義を有すること等を明らかにした。

寄生虫に関しては、回虫・鞭虫・鉤虫等の土壌媒介寄生虫感染事例に関する文献調査及び食品検査機関での検査成績集計を通じ、過去に比べ症例数は激減しているが、現在も継続発生がみられる現状を把握した。また、野菜等の虫卵汚染は継続している一方、一般的な国内販流通製品における汚染はほぼないと考えられた。更に北海道産「行者ニンニク」での虫卵検査を行ったが全て陰性を示し、一般流通品におけるエキノコックス汚染危害は低いと考えられた。

容器包装詰低酸性食品のボツリヌス対策に関しては、過去の指導内容から理化学性状（pH）に逸脱を示す容器包装詰低酸性食品としてある種の「たくあん」製品が該当する事実を把握し、当該製品中でのボツリヌス菌の生存増殖性を検討した。長期保存試験を通じ、本菌は増殖しないが、芽胞として長期生残する実態を把握した。また、本菌の増殖に求められる窒素源・炭素源等の食品特性に関する情報収集が本菌の食品汚染危害を予測する上で有効と目された。更に、動物愛護の観点から代替法が求められるボツリヌス毒素試験法について、FRET法による定量検出試験を実施し、A型毒素はマウス毒性試験法同等の検出感度を示したが、B型毒素については感度に支障があり、継続した検討が必要と考えられた。

情報収集に関する項目としては、米国・カナダ・欧州での非動物性食品の回収・汚染情報を解析し、当該国における具体的な汚染食品及び病原体を把握した。また、米国・欧州での非動物性食品由来アウトブレイク事例を解析し、これらに関連した食品及び病原体を把握した。更に、欧州での非動物性食品に関する微生物規格基準の実態と今後の動向に関して、文献調査を行い、複数の規格基準設定に関する提案内容を取り纏めた。また、米国での非動物性食品に関する微生物基準動向として、米国食品医薬品局により最終規則化された、「農産物の安全に関する最終規則」の内容を取り纏めた。

本研究では、白菜浅漬を原因食品とする腸管出血性大腸菌 O157 集団食中毒事例や、あずきばっとうによる食餌性ボツリヌス症等を契機として、非動物性の加工食品等における多岐にわたる病原微生物の汚染実態に着目し、実態把握・検証・情報収集という複数の柱から構成された研究班での活動を通じて、複数の事案の解決を行うことができた。一方で、リステリア菌の汚染をモニタリングする製造工程管理の在り方、真菌・酵母に関する衛生規範の基準内容、あるいはボツリヌス毒素の検出法に関する点等は、非動物性食品における望ましい微生物規格基準の在り方を議論する上で必要不可欠であり、今後の検討すべき課題として提示された。

研究代表者	
朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所
研究分担者	
春日 文子	国立医薬品食品衛生研究所
窪田 邦宏	国立医薬品食品衛生研究所
杉山 広	国立感染症研究所
田口 真澄	大阪府立公衆衛生研究所
廣井 豊子	国立大学法人帯広畜産大学
百瀬 愛佳	国立医薬品食品衛生研究所
協力研究者	
天沼 宏	国立医薬品食品衛生研究所
荒川京子	国立感染症研究所
五十君静信	国立医薬品食品衛生研究所
生野 博	(株)ビー・エム・エル
太田利子	相模女子大学
荻原恵美子	国立医薬品食品衛生研究所
奥村香世	国立大学法人帯広畜産大学
賀川千里	国立感染症研究所
神吉政史	大阪府立公衆衛生研究所
倉園久生	国立大学法人帯広畜産大学
小西良子	麻布大学
酒井真由美	国立医薬品食品衛生研究所
柴田勝優	国立感染症研究所
須田貴之	日本食品分析センター
高鳥浩介	NPO 法人カビ相談センター
高鳥美奈子	NPO 法人カビ相談センター
高橋淳子	桐生大学
橘 理人	国立医薬品食品衛生研究所
田中詩乃	NPO 法人カビ相談センター
中村寛海	大阪市立環境科学研究所
林 賢一	(株)日吉
堀内朗子	日本食品衛生協会食品衛生研究所
牧野壮一	京都聖母女学院短期大学
榊田和彌	国立医薬品食品衛生研究所
村松芳多子	高崎健康福祉大学
森嶋康之	国立感染症研究所
山本詩織	国立医薬品食品衛生研究所
吉村昌徳	日本冷凍食品検査協会

(敬称略、五十音順)

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌やボツリヌス菌等、病原微生物の中には人命を脅かすものが少なくない。これ迄の対策は主に動物性食品で進められてきたが、近年では漬物や容器包装詰低酸性食品等に起因する食中毒事例が相次いでおり、汚染実態を把握し、食の安全確保に必要となる基礎的知見を集積することが求められている。

上述の食品に関連して発生する O157 等の微生物による食中毒の危害評価は必要不可欠であるが、これ迄の知見の多くは定性的な汚染実態に留まり、定量的知見は十分に得られていない。危害性判断に当たっては、従って国内外の情報収集・整理および実態を捉えた定量データの集積が必要となる。

更に食品の製造加工過程では種々の衛生指標菌を用いた衛生管理が行われるが、申請者等の予備調査では動物性食品とは異なり、植物性食品は生育過程を通じて環境由来の多様な細菌叢を形成しており、それらの多くが指標菌として検出される実態も明らかになりつつある。従って、非動物性食品に対する適切な指標菌の在り方を議論する為の基礎知見を得ることが、衛生管理を通じた安全確保に必須と考えられる。この他、漬物の衛生規範において規定される成分規格のうち、カビ及び酵母に関しては、昭和 62 年以降改正が行われていないが、市販製品における汚染実態については不明であることから、その実態を把握・整理すると共に、健康危害性に関する考察を行う必要性が考えられた。

また、毒素産生微生物の中でも危害性の高いボツリヌス菌については、容器包装詰低酸性食品等における汚染が重篤な食中毒へとつながる可能性があることから、その安全確保にはこれまでも審議が重ねられてきた。流通品から本菌は検出されておらず直ちにその規格基準を設定する状況にはないが、事業者は食中毒を未然に防止する対策に迅速に取り組む必要がある。本研究では流通品の理化学性状の調査に加え、本菌の食品内挙動を検討し、今後の対策の在り方を判断するための知見の集積をはかることとした。加えて、ボツリヌス毒素の検出法は動物愛護の高まりを見せる昨今においても、動物を用いた毒性試験が適用されており、代替的試験法の構築を行うべきとの国際的認識があるため、その対応についても、検討すべき課題と考えられた。

上記食品では細菌に加え、過去には輸入キムチの虫卵汚染が問題となる等、寄生虫も非動物性食品を介した危害因子の一つとして捉えられる。特に生野菜では灌漑水の寄生虫(卵)・原虫の他、回虫・蟯虫・テニア科条虫等複数の寄生虫汚染が懸念されており、海外からの輸入食品に依存している、わが国の食実態を踏まえると、国内外での寄生虫汚染実態の把握は必須と考えられる。また、近年では、感染者は激減したものの、国内での感染が確実な症例の報

告もあり、感染源と目される生鮮野菜・果実への虫卵汚染は、現在も継続していると推測される。ただし、感染源となった野菜の種類や症例数の推移等については不明な点が多く、実態把握が求められる。

非動物性食品による食中毒事例は、国外においても顕在化しつつあり、欧米を中心とした海外諸国における当該食品中の病原微生物汚染実態とその対策として制定されている規格基準に関する情報収集は、国内流通食品における実態把握と並行して、取り組み、それらの融合を通じて、より効率の良い知見の集積を図ることとした。

以上の背景をふまえ、本研究では、国内流通浅漬け製品における衛生指標菌の定量検出及び主要病原細菌の検出状況に関する検討を行った。このうち、複数製品で継続的なリステリア汚染を示す製品を見出し、同製品製造施設での環境調査を通じ、汚染箇所の特定と除去方法について検討を行った。漬物の衛生規範改正に伴う浅漬け製品の衛生実態変化を調査すると共に、指標菌のあり方に関して考察した。また、これまで殆ど明らかとなっていなかった、漬物中の真菌・酵母汚染実態を調査し、主要分離菌同定を通じ、健康危害性と今後の衛生規範の在り方に関する考察を行った。寄生虫に関しては、文献検索と臨床・食品検査機関におけるデータ解析を通じ、非動物性食品の喫食を通じた土壌媒介性寄生虫感染症の発生危害性について議論することとした。更に、生鮮野菜等を対象とした寄生虫卵検査法の開発を行った。容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス対策として、現行の同製品の中で、厚労省が指導する理化学性状から逸脱する製品の有無を調査すると共に、逸脱の認められた製品を対象として、当該菌の生存・増殖性に関する検討を行った。更に、ボツリヌス毒素の定量検出法として、動物毒性試験の代替法として期待される試験法について、検出感度等に関して検討した。情報統計の分野では、欧米での非動物性食品による被害実態、食品汚染実態等の収集・整理を行うと共に、当該国における非動物性食品に対する規格基準をはじめとした衛生対策に関する情報を取り纏めた。

B. 研究方法

1. 細菌汚染実態に関する研究

①浅漬け製造施設におけるリステリア菌株の持続汚染性及び汚染除去法に関する研究

1. 市販野菜浅漬の細菌汚染実態把握

1) 試験材料

2013年5月に10検体、8月に30検体、10月に30検体、2014年2月に30検体の合計100検体を大阪府内の小売店舗で購入した。検体の原材料区分は、果菜類が23検体、葉菜類が57検体、根菜類が19検体、混合が1検体であった(表1)。各検体は購入後、大阪府立公衆衛生研究所に冷蔵状態で

輸送し、速やかに試験に供した。

2) 細菌検出試験

試験項目は各検体のpHと、衛生指標菌(一般細菌、大腸菌群、 β -グルクロニダーゼ産生大腸菌)の定量試験、ならびに生鮮野菜に関連する主要食中毒細菌である腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌、*L. monocytogenes*の定性試験を実施した。*L. monocytogenes*については、定量試験も行った。

衛生指標菌の菌数測定は、検体25gにbuffered peptone water (BPW)を225mL加え、30秒間ストマッカー処理を行った試料液をBPWで希釈し、スパイラルプレーターを用いて平板培地に塗抹し、培養後、機器メーカーの指示書に従って集落数を数えて計算を行った。平板培地は、一般細菌数測定には標準寒天培地、大腸菌群数測定にはViolet Red Bile Lactose寒天培地(VRBL)、 β -グルクロニダーゼ産生大腸菌数測定にはトリプトン胆汁酸X-グルクロニド培地(TBX)を使用した。

腸管出血性大腸菌の定性試験は上記のBPW液を37°Cで20時間培養し、培養液中のVT遺伝子をLoopamp腸管出血性大腸菌検出試薬キット(栄研化学)にて検索し、陰性の場合には検出せずとした。サルモネラ属菌の定性試験はISO 6579:2002に準拠して行い、*L. monocytogenes*の定性および定量試験はISO 11290-1およびISO 11290-2:2004に準拠して行った。

3) *L. monocytogenes*の血清型別

リステリア型別用免疫血清(デンカ生研)を用いて、O抗原とH抗原の組み合わせで血清型別を行った。

2. 製造施設の調査

3社(A、B、C社)に施設調査の協力を求め、その地域を管轄する行政の食品衛生担当者とともに製造環境の検証を行った。施設Aは2回(2014年6月16日と2015年1月13日)、施設Bは3回(2014年6月30日、8月18日、11月4日)、施設Cは1回のみ(2014年7月24日)実施した。

検査材料として、施設の機械・器具類と床のふき取り材料、および食品(原材料、中間製品、最終製品)の合計115検体(施設A:37検体、施設B:54検体、施設C:24検体)を採取し、*L. monocytogenes*の検出を定性試験および定量試験で行った。

3. *L. monocytogenes*分離菌株の遺伝子解析

施設Aは市販製品からの分離株および2014年6月施設調査での分離株の36株、施設Bは市販製品からの分離株および施設調査での分離株23株、施設Cは26株についてパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法による解析とRibotypingを行った。

PFGEの制限酵素はApaIおよびAscIを用い、CDCの*L. monocytogenes* Pulse Net protocolに準じて実施した。RibotypingはRiboPrinter system(Du Pont)を用い、製造者の指示書に従い、制限酵素はEcoRIを使用し、各菌株のribotyping patternを得た。菌株の同一性評価はDupont IDを指標として行った。

②市販浅漬け食品における細菌汚染実態と衛生指

標菌に関する研究

1. 食品検体の収集と構成

平成 25 年 6 月～10 月の間に東京都および神奈川県内で市販される浅漬け製品、計 66 検体を購入し、以下の試験に供した。当該検体は購入後、速やかにアイスボックスにて試験実施機関に搬入・前処理を行った。購入検体の原材料別構成は以下のとおりである：白菜 30 検体；茄子 18 検体；きゅうり 6 検体；野沢菜 6 検体；大根 6 検体。

2. 衛生指標菌定量試験

各検体より無菌的に 25g を採材し、約 3 x 3cm 角に細断した後、滅菌ストマック袋（関東化学）に入れ、緩衝ペプトン水（Oxoid）225 ml 加えて、1 分間ストマッキング処理を行った。同懸濁液 100 μ l を標準寒天培地（Oxoid）、VRBL 寒天培地（Oxoid）および TBX 寒天培地にそれぞれ 2 枚ずつ、スパイラルプレーター（Interscience）を用いて塗布し、一般細菌数、大腸菌群数、 β -グルクロニダーゼ産生大腸菌数を求めた。

3. 各種病原細菌の検出

上述の緩衝ペプトン水懸濁液を 37°C で 20 時間培養した後、①腸管出血性大腸菌（EHEC）の検出にあたっては、同培養液より全 DNA を抽出し、stx 遺伝子をターゲットとした PCR 反応によるスクリーニングを行った。同反応で陽性が見られた場合には、免疫磁気ビーズを用いた分離培養を行うよう準備を行った。②サルモネラ属菌およびリステリア・モノサイトゲネスの検出については、ISO 法に準拠して実施した。

4. 菌叢解析

上記 2. にて調整した緩衝ペプトン水懸濁液 10ml より、PowerFood DNA Extraction kit（MO Bio）を用いて、全 DNA を抽出した。これを鋳型として、16S rRNA 792-1152 領域を PCR 増幅した。増幅産物を定量した後、Ion OneTouch Duo システムを用いてエマルジョン PCR 及び精製をおこなった。その後、サンプルを 318 v2. Chip 上へロードし、Ion Torrent PGM 装置で配列解読を行った。

5. データ解析

取得配列データは、Ion Torrent サーバー上で、シーケンスタグ別に識別した後、fastaq フォーマットで出力した。配列ファイルは CLC Genomic Workbench v. 6.5 を用いて不要配列を除去した。Blast 検索後、Metagenome@KIN を用いて、階層解析・主成分分析等を実施した。

6. 白菜浅漬けの実験的製造とこれに伴う 0157 添加回収試験、指標菌・構成細菌叢変動解析

市販白菜より 25g を採材し、約 3 x 3 cm に細分したものを滅菌ストマッカー袋中に入れ、食塩（最終濃度 2%）あるいは市販浅漬けの素（指示書に従って調整）を加えて、4°C にて保存した。保存開始と共に、腸管出血性大腸菌 0157 EDL933-KM 株を 1.4×10^2 CFU/g となるよう、同検体に接種または非接種し、0、3、6、12 日間の保存期間を経て、各検体（N=3）に 225ml の緩衝ペプトン水を加え、ストマッカー処理を行った後、以下の試験に供した。

①指標菌数：一般細菌数および大腸菌群数を項目 2. に準じて求めた。

②0157 挙動：カナマイシン（30 μ g/ml）を含むソルビットマッコンキー寒天培地（栄研化学）を用い、発育集落数から食品中の生存菌数を求めた。

③菌叢解析：項目 4-5. の記載方法を用いた。

7. 浅漬け検体の比較解析

計 4 製造施設にて製造され、都内で市販される、8 製品を対象として、改正前（2013 年 2 月）及び改正後（2015 年 3 月）に、各製品 6 検体を購入した。なお、各製品の主原料となる野菜は、白菜・茄子・胡瓜・大根・野沢菜である。各検体に係る指標菌定量検出及び菌叢解析は上述と同様である。

③浅漬け製造工程における微生物挙動に関する研究

1. 検体採取

平成 26 年 2 月に神奈川県内の浅漬け製造事業者の協力を得て、同製造施設内でハクサイおよびキュウリの浅漬け工程中より、中間製品および施設ふき取り検体を採取した。計 36 検体について、指標菌の定量検出および主要病原細菌の検出試験に供した。製造ラインの概要および各製造過程の概要は、図 1-3 に記した。

2. 衛生指標菌定量試験

各検体より無菌的に 25g を採材し、約 3 x 3cm 角に細断後、緩衝ペプトン水 225 ml を用いて懸濁溶液を作成した。同懸濁液 100 μ l を標準寒天培地（Oxoid）、VRBL 寒天培地（Oxoid）および TBX 寒天培地にそれぞれ 2 枚ずつ、スパイラルプレーター法により塗布し、一般細菌数、大腸菌群数、 β -グルクロニダーゼ産生大腸菌数を求めた。施設拭取り検体については懸濁原液を同様に試験に供した。

3. 各種病原細菌の検出

腸管出血性大腸菌 0157/026/0111 の検出は、「腸管出血性大腸菌 026、0111 及び 0157 の検査法について」（平成 24 年 12 月 17 日付、食安監発 1217 第 1 号）によった。また、サルモネラ属菌およびリステリア・モノサイトゲネスの検出は、ISO6579:2002 および ISO11290:1997 に準じて行った。

4. 構成菌叢解析

各検体より DNA 抽出後、PCR により 16s rRNA 部分領域を増幅した。E-gel および AMPure XP を用いて、増幅断片を精製した後、各検体を等量混合してライブラリーを作成した。同ライブラリーは Ion PGM シーケンサーを用いて解析を進め、得られた配列は、CLC Genomic workbench でトリムを行い、Local blast 検索を行うことで、各検体の構成菌叢に関するデータを取得した。

5. 塩漬けに伴う指標菌及び菌叢動態解析

市販の生鮮白菜を購入し、おにつばを除去後、十分量の水道水で 2 回洗浄し、同野菜を 25g ずつに裁断した。225ml の食塩水（0、2、10%）に加え、15°C で 3 日間漬け込みを行った。漬け込み後の検体を、食塩水より取り出し、225ml の緩衝ペプトン水中にて懸濁後、同懸濁液を用い、指標菌（一般細菌数及び大腸菌群数）の測定および菌叢解析を実施した。

④漬物の衛生規範に関する実態調査—真菌調査—

1) 調査および材料

平成 27 年 4 月～12 月の期間に国内で販売されている漬物を購入した。入手地域・入手漬物の種類は別途図表に纏めた。本研究で供試した漬物検

体は国内広域より入手した。それらの多くは、極めて十分に衛生管理された漬物ではなく、その地域で食品として販売されている漬物を対象とした。また漬物の種類は、規範にある材料を広く入手するため計画的に集めるよう心がけた。

2) 試験法

(i) 酵母の試験法 (漬物の衛生規範による)

酵母の試験法は真菌であることからポテトデキストロース寒天培地を基本に抗生物質のクロラムフェニコール、プロピオン酸ナトリウム、および塩分として NaCl を添加した培地で試験する。培養方法として塗抹法または混釈法で、平板 3 枚の平均集落数である。

(ii) カビの試験法 (漬物の衛生規範による)

カビの試験法はポテト・デキストロース寒天培地を基本に抗生物質のクロラムフェニコールを添加した培地で試験する。培養方法としては塗抹法が用いられており、真菌用培地平板 3 枚の平均集落数と記されている。しかし具体的な培地摂取量が記載されていない

(iii) 漬物の衛生規範 (製品の適合要件)

製品 (すべての漬物) について「カビおよび産膜酵母が発生していないこと」「異物が混入していないこと」と適合条件が付記されている。また、容器包装に充てん後、加熱殺菌したものにあっては、「カビが陰性であること」「酵母は検体 1g につき 1,000 個以下であること」の 2 要件が示されている。これらの試験方法および適合要件を考慮して入手した 105 試料の漬物について試験を実施した。なお、食品の健康志向から減塩漬物が、どの程度流通しているか、また保存料の有無についても確認した。

2. 寄生虫による汚染に関する研究

1) 文献調査成績

(i) 症例数

医学中央雑誌データベース (医中誌 Web) を用い、1990 年 1 月から 2015 年 12 月までの原著論文から国内で感染した回虫・鞭虫・鉤虫症例を抽出し、年別症例数を明らかにすると共に、患者の感染源となった汚染野菜の特定を試みた。また、症例数については、臨床検査会社 BML の協力を得て、寄生虫症例の中から、回虫症・鞭虫症・鉤虫症と診断された症例の数について提示を受けた。

(ii) 感染源

各症例の感染源野菜に関しては、論文著者の記述に従い、生野菜、無農薬野菜、有機野菜に分類した。なお本研究では、農薬または化学肥料を使用しない栽培方法によって作られた野菜を「無農薬野菜」と定義した。したがって人糞 (いわゆる下肥) のみを

肥料として栽培された野菜は、無農薬野菜とした。また、本研究では、論文著者が「有機野菜」と記述した場合は、その記述をそのまま採用した。

2) 登録検査機関へのアンケート調査

公益財団法人目黒寄生虫館では、食品等から検出された異物の検査依頼および鑑定依頼を受託してきた。検査の委託者は食品製造に携わる企業や食品検査機関の他、学校などの教育機関、地方公共団体、更に一般市民となっている。この異物の検査・鑑定依頼の記録 (1990 年～2008 年の 19 年間) を再整理し、非動物性食品における寄生虫の汚染実態を調べた。まず依頼検体をその種類から、非動物性食品、動物性食品、人体・動物および環境由来の 3 つに大別した。次に非動物性食品および動物性食品と判定された検体を、公益財団法人日本適合性認定協会 (JAB) の食品分類表を活用した朝倉ら (2013) の分類に従い、10 のカテゴリーに振り分け、異物の検査・鑑定依頼が多い食品群を抽出した。更に非動物性食品から検出された異物を、人体寄生虫とそれ以外に 2 分し、寄生虫種別の検体数を求めた。

厚生労働省の「食品衛生法上の登録検査機関における検査実績」に掲載されている登録検査機関のうち、自主検査件数の多い上位 16 機関と、公益法人目黒寄生虫館に依頼し、2005 年以降、毎年の輸入キムチの寄生虫卵検査の実施件数と陽性件数について、記入式のアンケート調査を行った。

3) 新たな検査方法の確立：ストマッカー法および超音波法の検討

本試験は、ストマッカーや超音波洗浄装置の使用に精通している日本食品衛生協会食品衛生研究所に委託した (試験検査成績書は各年度の報告書に添付したので参照されたい)。検査の対象にはブタ回虫を用いることとし、屠畜場に依頼して自然感染ブタから検出されたブタ回虫を入手した。虫卵を付着させる検体として白菜を選び、試験のつど雌成虫の臍と子宮 (遠位端役 1cm) から、卵殻表面にタンパク膜が完成した虫卵を分離して、模擬検体 (虫卵添加検体) を調製した。

予め、試験条件設定のための予備試験を実施し、ストマッカー法ではストマッカー袋による検査可能な検体重量と洗浄液量について検討し、また超音波法では超音波処理の時間および洗浄容器の洗浄回数等を検討した。更に虫卵の検出操作方法である浮遊法と沈殿法についても比較検討を行った。

本試験における、模擬検体の接種回虫卵数は 1,000 個および 200 個の 2 条件とし、いずれの試験法においても各々 5 回の実験を繰り返して回収虫卵数を求めた。得られた値は F 検定で分散を確認し、t 検定で有意差を調べた。

4) 輸入キムチにおける虫卵検査

(i) 被験物質

平成 28 年度 1 月に市販韓国産キムチ 2 点および中国産キムチ 3 点を被験物質とした。各キムチ 100 g を洗浄容器に入れ、500 mL の洗浄液を加えて、10 分間静置後、以下の操作を行った。

(ii) 検査法

検体入の洗浄容器を超音波洗浄し、洗浄液全量をろ過しながら 1L 容の液量計に移し、同量の洗浄液で洗浄容器を洗い、その洗浄液も液量計に移した。60 分以上静置後、上清約 900 mL を吸引除去した。得られた洗浄液・沈渣部分は 50 mL の遠沈管 2 本に分注した後、液量計の管壁を精製水 50 mL で 2 回洗い、計 200mL 分を 2,000 回転で 5 分間遠心分離した。沈渣を回収後、精製水及び酢酸エチルを加えて激しく混和し、更に遠心分離した。上清除去後、沈渣にシヨ糖比重液 ($d=1.27$) を加えて混和し、浮遊法にて虫卵の回収操作を行った。顕微鏡下に全視野を観察して虫卵数を求めた。

5) 行者ニンニクにおける虫卵検査

(i) 被験物質

北海道で市販される行者ニンニク計 41 検体を対象とした。感染リスク低減のため、検体は購入後、試験開始まで 7 日間以上、 -80°C で冷凍した。検体は、1L 容洗浄容器に入れ、5 倍量の洗浄液を加えて、約 10 分間静置後、以下の操作を行った。

(ii) 検査法

検体からの虫卵の剥離操作は、5 分間の超音波洗浄によった。超音波洗浄後、洗浄液の全量を 1,000mL 容の円錐型液量計に移し、同量の洗浄液で洗浄容器を洗い、その洗浄液も液量計に移した。比重液には硫酸マグネシウム塩化ナトリウム溶液 ($d=1.23\sim 1.24$) を用いた。

3. 容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス菌対策に係る情報収集と食品内挙動に関する研究

1) ボツリヌス菌の食品内動態試験 (ボツリヌス菌添加/保存試験)

(i) 芽胞液の作製

各供試菌株をクックドミート培地で一晚嫌気培養後、芽胞調製用培地 10 mL に接種し 30°C で更に一夜培養した。培養液は 80°C 20 分間の加熱処理後、再び 30°C で培養した。同加熱処理を翌日および一週間後に繰り返した後、滅菌水で 3 回洗浄した。芽胞形成は、芽胞染色後、鏡検した。

(ii) 栄養型菌液の調製

同上の芽胞液を加熱処理に供した後、卵黄加 CW 寒天培地に塗布し、 30°C で 24 時間嫌気培養した。発育集落を滅菌精製水に懸濁し、栄養型菌液とした。栄養型菌液の菌数は、クロストリジア寒天培地を用いて混釈培養し、黒色集落数を測定し算出した。

(iii) 食品検体への菌液添加

芽胞液 (A 型菌 5 種混合あるいは B 型菌 5 種混合) を、加熱処理後、検体 1 g あたり 10^3 cfu 前後となるように添加し、 4°C 、 25°C あるいは 30°C

に保存した。菌液添加日を保存 0 日目とし、15 日、30 日、100 日、180 日、270 日、360 日目に、各保存温度につき 4 検体ずつ食品内の菌数測定に用いた (0 日目、15 日目、30 日目は平成 26 年度の検討)。

栄養型菌液については、検体 1 g あたり 10^3 cfu 前後となるように添加し、 4°C あるいは 30°C で保存し、60 日後に食品内菌数を測定した。

また、本菌の発育に必要な栄養素の補充として 20 倍濃縮 BHI broth を検体 1 g あたり 0.25 μL 添加した。その後、加熱処理した芽胞液を添加し、 4°C または 30°C で 30 日間保存後、食品内菌数を測定した。

上記の食品内接種にあたっては、封かん強度測定器用ゴムシール (サン科学) を使用した。

(iv) 理化学性状 (pH・酸化還元電位) の測定

ボツリヌス菌非添加の検体を用い、保存試験期間を通じた、理化学性状変動を測定した。検体容器包装外部を 70% エタノールで消毒後、滅菌済みメスを用いて容器包装および検体食品の一部を切開し、pH 電極ならびに酸化還元電位用電極を食品内部に挿入して、pH および酸化還元電位を測定した。

(iv) 生菌数 (一般細菌数) の測定

無菌的に取り出した検体 100 g を細切後、滅菌ペプトン加生理食塩水 100 mL を加え、ストマッカーにて十分混和させ、これを試料原液とした。10 倍希釈液を作成した後、各希釈液 1 mL を標準寒天培地に混釈法により接種し、 35°C で 48 時間培養を行ない、生育集落数を求めた。

(v) クロストリジア属菌数の測定

同上の希釈試料液 1 mL をクロストリジア寒天培地に混釈法にて接種し、 35°C で 48 時間嫌気培養後、生育した黒色集落数を計測した。

2) ボツリヌス菌の増殖を許容する酸素濃度範囲に関する検討

クックドミートブイオンを用いて、 37°C で嫌気培養したボツリヌス菌約 10^3 cfu をクックドミートブイオン 10 mL に接種し、BIONIX 低酸素培養キット (スギヤマゲン) を用いて、酸素濃度を 0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 2.0, 4.0% に調整した上で、 37°C 下にて最大 1 週間まで培養を継続した。増殖確認は、クロストリジア寒天培地への混釈培養により行った。

3) ボツリヌス毒素定量検出法の検討

(i) マウス毒性試験法 (毒素の *in vivo* 検出法)

精製ボツリヌス A 型毒素および B 型毒素は、ゼラチン加リン酸緩衝液で段階希釈した。菌培養液の場合は、クックドミート培地での菌培養液を 3,000 rpm 20 分間遠心し、その遠心上清を 0.45 μm のメンブランフィルターで濾過し、ゼラチン加リン酸緩衝液で段階希釈した。希釈した各試料液を 0.5 mL ずつ 2 匹のマウスの腹腔内に接種し 4 日間観察した。陰性対照として、試料液を 100°C 20 分間加熱処理することで毒素の不活化したもの作製し、同様に 0.5 mL ずつマウス腹腔内に接種し 4 日間観察した。

(ii) *in vitro* 定量検出法

A 型毒素には BoTest™ A/E Botulinum Neurotoxin Detection Kit を、B 型毒素には BoTest™ B/D/F/G

Botulinum Neurotoxin Detection Kit を用いた。基質反応後は、434 nm 励起光下で 470 nm 及び 526 nm の蛍光強度を測定した。毒素活性は、470 nm と 526 nm の蛍光強度比 (RFU at 526 nm / RFU at 470) より算出した。B 型毒素に関しては必要に応じて事前にトリプシンによる活性化を行った。

4. 国外における非動物性食品の病原微生物汚染の実態とその対策に関する調査

25 年度

1. データ収集

回収等に関するデータは米国食品医薬品局 (US FDA: US Food and Drug Administration) のデータベース (<http://www.fda.gov/Safety/Recalls/>)、カナダ食品検査庁 (CFIA: Canadian Food Inspection Agency) のデータベース (<http://www.inspection.gc.ca/about-the-cfia/new-sroom/food-recall-warnings/eng/1299076382077/1299076493846>) から各国での非動物性食品の病原微生物汚染に起因する回収等のデータを抽出した。米国 FDA については 2004 年～2013 年、CFIA についても 2004 年～2013 年 (2011 年は CFIA のデータベース移行の影響で半年分) のデータを使用した。これらの回収情報は判断が困難なものも含まれていることから個々の情報の関連づけや統合は行わなかった。また対象製品の食材に関しては研究分担者が回収情報にもとづき独自に分類を行った。

欧州連合 (EU: European Union) での非動物性食品に関わる病原微生物汚染等の情報に関しては、「食品および飼料に関する早期警告システム (RASFF: Rapid Alert System for Food and Feed)」の 2001 年～2011 年のデータをまとめた報告書 (参考文献 1) が欧州食品安全機関 (EFSA: European Food Safety Authority) より公表されており、これを利用した。

米国での非動物性食品を原因食品とするアウトブレイクについては、米国疾病予防管理センター (US CDC: Centers for Disease Control and Prevention) の食品由来疾患アウトブレイクサーベイランスシステム (FDOSS: Foodborne Disease Outbreak Surveillance System) のアウトブレイクデータを蓄積したアウトブレイク情報データベース (FOOD: Foodborne Outbreak Online Database)

(<http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/>) から、2006 年～2011 年に発生したサルモネラおよび志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) を病因物質とするアウトブレイクを抽出した。

欧州でのアウトブレイクについては、参考文献 1 の Table 26 (Reported outbreaks associated to FoNAO in the reporting countries in accordance with Directive 2003/99/EC, 2007-2011) にまとめられている 2007～2011 年の欧州の非動物性食品を原因食品とするアウトブレイクのリストを使用した。欧州のアウトブレイクデータの解析においてはサルモネラ、ベロ毒素産生性大腸菌 (VTEC)、およびセレウス菌を病因物質とするアウトブレイ

クを対象とした。

2. データ集計・解析

各種データは Microsoft Excel に入力し、Microsoft Access 等のデータベースソフト等を利用して各種の集計、解析を行った。

26 年度

2011 年 5、6 月のドイツにおけるフェヌグリークスプラウトの喫食を原因とする STEC O104 大規模アウトブレイクを受け、欧州委員会 (EC) は EFSA に対し、EU での非動物性食品による食中毒発生の実態、関連するハザードのランク付け、リスク因子、対策の選択肢などについて科学的見解を示すよう要請した。これに対し EFSA は、2013 年 1 月にパート 1 報告書 (参考文献 1) を発表し、さらに 2014 年 3～12 月に、それぞれ異なる果物・野菜類を対象とした 5 報からなるパート 2 報告書 (参考文献 3～7) を表した。パート 2 報告書には EC の要請にもとづき、微生物規格基準 (Microbiological Criteria) の設定に関する EFSA の見解も記載されている。

EFSA はパート 1 報告書において、食品と病原体との間の関連の強さ、患者発生数、疾患実被害、食品の消費量、汚染率などの 7 項目からなる基準に従って、EU における非動物性食品と病原体の組み合わせをランク付けしている。パート 2 報告書が対象とした果物・野菜と病原体の組み合わせ (「サラダ用葉物野菜におけるサルモネラおよびノロウイルス」、「ベリー類におけるサルモネラおよびノロウイルス」、「トマトにおけるサルモネラおよびノロウイルス」、「メロン・スイカにおけるサルモネラ」、「鱗茎野菜・ニンジンにおけるサルモネラ、エルシニア、赤痢菌、およびノロウイルス」) は、このパート 1 報告書のランキング結果にほぼ沿って選出されている。

なおパート 2 報告書において、「ベリー類」はイチゴ、ラズベリー、ブラックベリー、ブルーベリーなど、「鱗茎野菜」はタマネギ、ニンニクなどを主に指している。

本研究では、これらのパート 2 報告書を精査し、微生物規格基準に関する見解を取りまとめた。

なおパート 2 報告書 5 報のうち「サラダ用葉物野菜におけるサルモネラおよびノロウイルス」に関する報告書 (参考文献 3) について、全体の構成を示すため、「目次」の部分の仮訳を資料として添付した (資料 1)。他のパート 2 報告書も同様の構成となっている。

27 年度

米国では食品安全対策の強化による消費者保護を目的として食品安全近代化法 (FSMA: Food Safety Modernization Act、資料 2 参照) が 2011 年に 1 月に成立し、それを実施に移すために「農産物の安全に関する規則 (Produce Safety rule)」が 2015 年 11 月に最終規則化された (資料 3 参照)。そこで、FDA が発表した「農産物の安全に関する最終規則: 必須要件」(資料 4) や関連資料 (資料 5) を中心に文献調査を行うことで、米国における非動物性食品 (果物・野菜等) に関する微生物基準の動向の把握を試みた。

C. 研究成果

1. 細菌汚染実態に関する研究

① 浅漬け製造施設におけるリステリア菌株の持続汚染性及び汚染除去法に関する研究

1. 市販野菜浅漬の細菌汚染実態把握

10月と2月の60検体について、pH値を測定・比較したところ、最低値は3.0、最高値は6.4であり、最頻値は5.2であった。

一般細菌数は季節により変動が見られ、8月は 10^4 CFU/g オーダーの製品が多く、10月は 10^2 CFU/g、2月は10 CFU/g未満のものが多く見られた(表2)。大腸菌群数は全体的に少なく、10 CFU/gを超える検体は8検体のみであり、130 CFU/gが最大値であった(表2)。β-グルクロニダーゼ産生大腸菌数は全て10CFU/g未満であり、腸管出血性大腸菌およびサルモネラ属菌も全ての検体で陰性であった(表3,4,5,6)。

一方、*L. monocytogenes* 検出は12検体で認められた。定量試験により菌数を測定できたのはわずかに2検体のみであり、それぞれ30CFU/gおよび10CFU/gであった。他の10検体は定性試験でのみ検出された(表7)。*L. monocytogenes* の血清型は、1/2aのみ検出は6検体、1/2bのみ検出は3検体、1/2aおよび1/2b検出は2検体、3cのみ検出は1検体であった。試験した100検体の製造施設は計55施設であったが、そのうち5施設で製造された検体から*L. monocytogenes* が検出され、3施設では異なる試験月の検体から複数回検出された。なお、これら*L. monocytogenes* 陽性検体のpH値は、4.4~6.0であり、一般細菌数および大腸菌群数は、本菌陰性検体の数値に比べて異なる事はなかった。

2. 製造施設の調査

1) 3施設の1回目調査

施設Aの製造工程は、下処理室、冷蔵室、下漬洗浄室、包装室の4つのゾーンに分かれていた(図1)。原材料の殺菌は電解次亜水(pH8.8、残留塩素50ppm、10分間処理)を使用していた。最初の調査では27検体採取し、冷蔵室床のたまり水、包装機や作業台のふき取り、さらに最終製品であるみぶなの浅漬からも*L. monocytogenes* が検出された。

施設Bの製造工程は、処理室、冷蔵室、包装室の3ゾーンであった(図1)。原材料の殺菌は微酸性次亜塩素酸水溶液(pH6.5、残留塩素30ppm、2分間処理)を使用していた。最初の調査では計26検体を採取し、冷蔵室床のふき取りや包装機のふき取り、さらに中間製品や最終製品である茄子の浅漬からも*L. monocytogenes* が検出された。

施設Cでは他の2施設と異なり下処理室でのLM検出が認められた(表8)。その他は床のたまり水や製品充填機のふき取り、そして最終製品の白菜の漬物からLMが検出された(図2)。本施設の2回目の調査は行っていない。

2) 施設A、Bの改善に向けた調査

施設Aでは1回目の調査の後、汚染箇所を熱湯をかける、スチームクリーナーで蒸気をあてるなどの対策を実施するよう、指導にあたった。

その後の2回目の調査では、主に1回目の検出箇所から検体を採取し、10検体中3検体から*L.*

monocytogenes を検出したが、前回と同じ場所の検体No.33と36の定量試験での菌数は減少しており、製品から*L. monocytogenes* は検出されなかった(表9)。検体No.32、33では血清型3bが検出されたが、この血清型は1回目の調査では、いずれの検体からも検出されておらず、分離箇所も限定的であった。

施設Bの1回目の調査では、冷蔵室や包装室が*L. monocytogenes* に汚染されていることが明らかになった(表10)。なかでも、食品に直接接触する重石板を押さえるパイプ棒の内部(検体No.9)と計量後の個装品に調味液を充填するノズル(検体No.10)から*L. monocytogenes* が検出されたことから、機械・器具類の汚染が最終製品への汚染につながっていると考えられた。機械・器具類の洗浄方法は水洗いのみであり、こすり洗いの必要性を認識していなかったことから、特に包装機に関連する器具の形状に適したブラシを用いた日常的なこすり洗いおよび次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いた浸漬・噴霧消毒の実施を指導した。

その後の2回目の調査では、製品から*L. monocytogenes* は検出されず、汚染箇所や菌数は顕著な低減を示したものの、前回菌数が多かった包装機の調味液充填ノズルと、スライダークからの*L. monocytogenes* 検出は続いていた(検体No.36、38)。また、下漬けを行う冷蔵室の床は常に濡れており、床の洗浄消毒が不十分な状況であったことから、冷蔵室の床を含め、施設内のこすり洗いの更なる徹底と次亜塩素酸ナトリウム溶液による消毒を指導した。

11月に実施した3回目の調査では、いずれの施設環境および食品検体も*L. monocytogenes* は陰性を示した。この調査の1ヵ月前に、行政の食品衛生担当者が洗浄度をその場で確認できるATPふき取り検査を実施し、効果的な洗浄方法や洗浄・消毒の作業手順書作成を具体的に指導していた。その結果11月の調査時には現場に応じた洗浄・消毒の作業手順書が作成されており、指導に従って下漬時使用器具の内部洗浄に適したブラシが活用され、冷蔵室の床の清掃も実施されるようになっていた。そして包装機の調味液充填ノズルの分解洗浄消毒、コンベアベルトなどへの次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いた消毒が実施されており、施設の衛生対策が改善された。

3. 分離菌株の遺伝子解析

1) PFGEによる解析

施設Aでは平成25年度分離株8株と平成26年度6月の分離株25株の合計33株を型別し、Aa (*Ascl*: A, *Apal*: aグループ)とBb (*Ascl*: Bグループ, *Apal*: bグループ)に大別された。

施設Bでは平成25年度分離株2株と平成26年度分離株20株の合計22株を型別し、血清型に関わらず全てCc (*Ascl*: C, *Apal*: c)であった。

施設Cでは26株を型別し、Aa (*Ascl*: A, *Apal*: aグループ)とCcの2つに分かれた。

2) リボプリンターシステムによる解析

施設Aでは36株のRibogroupがI,II,III,IV,Vに型別され、多様な型が存在していた。そのうち、Ribogroup IとIIが施設を持続汚染していると考

えられた。

施設 B の 23 株では、検体採取時期が異なっても同じ Ribogroup VI が検出されており、同一のグループが持続して施設を汚染していたと考えられた。

施設 C では、Ribogroup IV と VI の 2 つのグループが施設を広く汚染していると考えられた。

②市販浅漬け食品における細菌汚染実態と衛生指標菌に関する研究

1) 国内浅漬け製品における主要病原細菌の汚染実態と衛生指標菌の定量検出結果

平成 25 年 6 月～同年 10 月の間に、東京都および神奈川県内で市販されていた野菜浅漬け製品（白菜・茄子・きゅうり・大根・野沢菜）計 66 製品について、主要病原細菌（EHEC、サルモネラ属菌、リステリア・モノサイトゲネス）の検出を行ったが、いずれも陰性であった。衛生指標菌の定量結果としては、一般細菌数が平均値として、 $2.27E+06 \pm 5.67E+06$ CFU/g、大腸菌群数の平均値が $6.32E+04 \pm 2.89E+05$ CFU/g であり、 β -グルクロニダーゼ産生性大腸菌については何れも陰性であった。これらの成績を原材料別に観察したところ、白菜浅漬けでは、同時期に試験に供した他の原材料浅漬け製品に比べ、有意に高い菌数を認めた。

また、白菜検体の一部には、異なる時期の同一製品が含まれており、これらの衛生指標菌数の季節性挙動について検討することとした。結果として、6 月購入検体の一般細菌数・大腸菌群数が $1.1E+04$ CFU/g 及び $9.5E+03$ CFU/g であったのに比べ、8 月購入検体では $3.5E+06$ CFU/g および $5.3E+05$ CFU/g と上昇傾向を示した。10 月購入検体では、これに比べて減少傾向を示した ($7.4E+05$ CFU/g 及び $1.1E+04$ CFU/g)。

以上より、本研究における供試浅漬け検体では、主要病原細菌は検出されなかったが、指標菌の分布には原材料あるいは季節により差異を示すことが明らかとなった。

2) 菌叢解析

上記の調査結果を受けて、①原材料別、あるいは②季節別の指標菌の検出数値変動と、構成細菌叢変動の関連性について検証するため、メタゲノム解析を実施することとした。

(i) 原材料別の構成細菌叢変動

計 66 検体の構成細菌叢ならびに検体間の系統学的関連性について検討するため、メタゲノム解析を実施した。なお、本検討にあたっては、各検体より約 80,000-100,000 リードを解析に供した。Phylum 階層での系統樹を作成したところ、3 つのクラスター (A, B, C) に大別された。原材料等の検体情報を加味したところ、野沢菜および白菜 (10 月) 検体はクラスター A に、茄子、きゅうり、大根検体はクラスター B に、白菜 (6 月、8 月) および野沢菜検体はクラスター C に分類されることが明らかとなった。種階層での主成分分析によっても、これら供試検体は、3 クラスターに大別化される傾向が認められた。以上より、本研究で用いた浅漬け製品は、原材料別に構成細菌叢の共通性を示すことが明らかとなった。

(ii) 季節別の構成細菌叢変動

異なる時期に購入した白菜の浅漬け製品を対象

として、構成細菌叢の比較を行った。月別にそれぞれ 2 検体を無作為に抽出、比較した棒グラフを図 5 に示す。当該製品では気温上昇に伴い、*Leuconostoc* 科が優勢となる一方、*Lactobacillus* 科、*Pseudomonas* 科、腸内細菌科菌群の構成比は顕著に低減を認めた。以上より比較対象として用いた白菜浅漬け製品では気温上昇を認める夏季には *Leuconostoc* 科細菌が優勢となることが示された。

(iii) 白菜浅漬け中の 0157 挙動と構成細菌叢変動
白菜浅漬けを食塩或いは市販浅漬けの素を用いて実験的に製造し、0157 および指標菌の食品内変動を検討した。漬け込み液の種別を問わず、0157 は接種 (製造) 後、12 日目においても、接種時の菌数から顕著な低減を示さず、長期的な生残を示すことが明らかとなった。また、指標菌については、0157 添加により、一般細菌数が若干の低減を示したが、非添加群では、穏やかな増加傾向を示した。非接種群における大腸菌群の挙動については、市販浅漬けの素で製造された検体では保存 6 日目まで検出されなかったが、12 日目で 10^1 オーダーが検出された。一方、食塩で製造された検体では、保存 3 日目で 10^2 オーダーが検出された。同検体の製造・保存における細菌叢変動を検討したところ、供試白菜原料は約 80% が *Pseudomonas* 属菌により占められていたが、市販浅漬けの素を使用して製造された検体では、0157 接種により *Pseudomonas* 属の経時的減少と *Flavobacterium* 属・*Sphingomonas* 属の経時的増加が認められた。一方、食塩を用いて製造された検体では、0157 接種の有無に関わらず、*Pseudomonas* 属の更なる優勢化が保存を経るにつれて顕著となった。以上より、白菜の浅漬け中において 0157 は長期的に生残しうること、製造時の漬込み液の性状や保存時間により、同検体を構成する細菌叢は大きく変動することが明らかとなった。

(iv) 衛生規範改正前後の市販浅漬け製品における衛生指標菌数の比較

衛生規範改正前後に、4 施設にて製造された、計 8 種の浅漬け製品を対象として、製品・サンプリング時期の別にそれぞれ 6 検体における衛生指標菌数を直接塗抹法により求め、改正前後での各製品の衛生状況に関する知見の収集をはかった。

生菌数は、検体全体を対象とした改正前後での比較により有意差は認められず、改正前の平均生菌数は 2.52×10^6 CFU/g、改正後の同数値は 2.05×10^6 CFU/g であった。製品別では計 5 製品で改正前後で有意な数値変動が認められたが、残り 3 製品の同数値は改正前後で有意差を認めなかった。

大腸菌群については、製品全体での平均値が改正前で 1.77×10^3 CFU/g、改正後では 2.57×10^4 CFU/g と若干上昇傾向にあった。しかしながら、製品別での比較を通じ、同数値の多くは製品 No. 5 に因るものであることが明らかとなり、他の 6 製品について、製品別に改正前後間での同菌数を比較検討したところ、有意な減少を示した。なお、大腸菌については供試検体全てで陰性となった。

乳酸菌数は、改正前の平均値が 3.17×10^5 CFU/g であったのに対し、改正後には 9.93×10^5 CFU/g と増加傾向を示した。製品別では、計 4 製品で有意な増加を認めた。一方、製品 No. 2 および No. 3 の乳酸菌数は、改正後に減少を示した。

以上より、衛生規範の改正を通じて、供試対象とした市販浅漬け製品における各種衛生指標菌は顕著に変動したことが明らかとなった。

(v) 衛生規範改正を通じた浅漬検体の菌叢変動

I) 優勢菌叢の変動

衛生規範改正前における優勢構成菌叢は、*Roseateles* spp. (平均構成比 40.56%)、*Leuconostoc* spp. (同 19.72%)、*Rhizobium* spp. (6.71%)、*Sphingomonas* spp. (6.59%)、*Methylobacterium* spp. (3.28%) 等であった。一方、同規範改正後における各製品の優勢菌叢については、*Leuconostoc* spp. (32.52%)、*Lactobacillus* spp. (23.60%)、*Buttiauxella* spp. (11.20%)、*Pseudomonas* spp. (5.87%)、*Sphingomonas* spp. (5.47%) 等となり、何れの製品においても、最も優勢となる菌叢については改正前後で異なっていた。

II) 大腸菌群に分類される菌属の推定

大腸菌群に属すると推察される菌属として、供試検体より検出されたものは、*E. coli* の他、*Klebsiella*、*Buttiauxella*、*Citrobacter*、*Enterobacter*、*Pantoea* spp. 等があった。大腸菌群は、更に糞由来または環境由来とする細分類の他、病原性を指標とした識別も学術的には行われている。製品別に見た、改正前後での構成菌叢比較を通じ、製品 No. 5 では、*Buttiauxella* spp. の構成比が改正前の 2.02×10^{-2} % から改正後には 83.19% にまで急激に増加している実態が把握された。

III) 乳酸菌構成比の変動

構成菌叢解析を通じ、供試検体において乳酸菌として検出された菌属としては、*Aerococcus*、*Carnobacter*、*Enterococcus*、*Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Leuconostoc*、*Pediococcus*、*Streptococcus*、*Tetragenococcus*、*Vagococcus*、*Weissella* spp. 等が含まれると想定された。漬物製品一般において高頻度に検出される乳酸菌としては、*Lactobacillus* spp. や *Leuconostoc* spp. が知られている。浅漬け製品を構成する乳酸菌に該当する菌叢の構成比は、全検体では改正前で 25.40% であったが、改正後には 57.00% と増加傾向にあった。製品別での比較により、計 4 製品では改正後に有意な乳酸菌に該当する菌属構成比の増加が確認された。一方、製品 No. 2 及び No. 5 では改正後の乳酸菌構成比率は改正前に比べ、減少傾向にあった。

IV) 主要食中毒起因菌の構成比変動

EHEC、*Salmonella* spp.、*Listeria monocytogenes* は生鮮野菜・果実に起因する細菌性食中毒の主たる原因菌として知られる。改正前後でのこれら 3 菌属の構成比比較を行ったところ、*Salmonella* spp. については、衛生規範改正前の製品 No. 5 より検出され、その構成比は、 2.23×10^{-3} % であったが、改正後検体は何れも陰性を示した。また、*Listeria* spp. については、改正前の 3 製品より検出され、その構成比はそれぞれ 1.42×10^{-3} %、 1.05×10^{-2} %、 2.15×10^{-3} % であり、改正後検体での同菌由来遺伝子は製品 No. 5 の 1 検体のみから認められた。

③ 浅漬け製造工程における微生物挙動に関する研究

1. ハクサイ・キュウリ浅漬け製品の製造過程における衛生指標菌の挙動成績

平成 26 年 2 月下旬に、神奈川県内の浅漬け製造事業者の協力を得て、同製造施設内でハクサイおよびキュウリの浅漬け製品の中間製品および施設内ふきとり検体を採取した。以下に製品別に指標菌の検出状況を報告する。なお、何れの検体も β -グルクロニダーゼ産生大腸菌は陰性であった。

① ハクサイの浅漬け

ハクサイ浅漬け製品は、原材料を半割りし、2~5 日間 10% 食塩水中で塩漬後、殺菌工程に供されていた。工程別に指標菌数変動を比較したところ、原材料では一般細菌数が $4.79E+04$ CFU/g、大腸菌群数が $2.99E+03$ CFU/g であったのに対し、塩漬後の中間製品では一般細菌 $4.00E+03$ CFU/g、大腸菌群数が $3.33E+02$ CFU/g とそれぞれ約 10^1 オーダーの低減を示した。引き続き次亜塩素酸 Na を用いた殺菌工程を通じ、両菌数はそれぞれ $8.87E+03$ CFU/g 及び $8.75E+01$ CFU/g へ低減した。刻み・計量・包装工程を経た最終製品では一般細菌数が $5.47E+03$ CFU/g、大腸菌群は陰性を示した。

② キュウリの浅漬け

今回供試したキュウリの浅漬け製品については、原材料を裁断せずに殺菌、漬込み、化粧糠をつけて生産されていた。原材料では一般細菌数が $2.94E+05$ CFU/g、大腸菌群数が $2.43E+03$ CFU/g、殺菌工程直後ではそれぞれ $1.29E+04$ CFU/g および $1.67E+01$ CFU/g であった。その後の調味液中での 2 日間の漬込みを通じ、一般細菌数は若干の増加傾向を示したが、大腸菌群は陰性であった。最終製品の一般細菌数・大腸菌群数は概ね同様で、それぞれ $3.83E+03$ CFU/g 及び $5.00E+01$ CFU/g であった。尚、最終製品については化粧糠が付着していたが、通常、喫食前に水道水で化粧糠を洗い落とすと想定されたため、当該検体は、水道水で洗浄し化粧糠を洗い落とした後に、菌数の定量に供した。

2. 主要病原細菌の検出状況

主要病原細菌として腸管出血性大腸菌 0157/026/0111、サルモネラ属菌、リステリア・モノサイトゲネスの検出を試みた。

① ハクサイの浅漬け

ハクサイの浅漬け関連検体のうち、増菌培養液を用いて、ペロ毒素 (VT) 遺伝子の検出を行った。原材料・塩漬後検体の一部は疑陽性反応を示した。しかしながら、分離培養により典型集落は認められず、供試検体は腸管出血性大腸菌 0157/026/0111 陰性と判定された。サルモネラ属菌およびリステリア・モノサイトゲネスについても同様に全ての検体で陰性を示した。

③ キュウリの浅漬け

キュウリの浅漬け関連検体のうち、上述と同様に、キュウリ原材料および殺菌後の検体の一部で、VT 遺伝子陽性が認められたが、分離培養によって最終的に EHEC 0157/026/0111 は陰性と判定された。サルモネラ属菌及びリステリアについても全てで陰性を示した。

3. 白菜浅漬けの製造工程における菌叢変動

白菜浅漬け製造ラインでの原材料、中間製品(塩漬後、殺菌後) および最終製品検体より、各 2

検体を無作為に抽出し、菌叢解析に供した。最終的に、77科194属が検出された。以下に代表的な菌属に関する工程中の動態を記述する。

(1) *Pseudomonas* 属

Pseudomonas 属は全検体中の28.2%と最も高い占有率を占めた。本属の構成比率は、塩漬け工程で著しく減少したものの、殺菌後は再び上昇傾向を認め(11%)、最終製品での構成比率は5.7%であった。

(2) *Leuconostoc* 及び *Rhizobium* 属

当該菌属は、塩漬け後、それぞれ33.5%及び26.2%の構成比率を示した一方、他の工程ではいずれも5%以下であった。これらの菌属は、葉物野菜から高頻度に検出されることが知られている他、10%以上の食塩を含む、キムチ等の発酵食品からも検出されることが知られている。

(3) *Pedobacter* 属

殺菌工程後の検体からは、*Pedobacter* 属が高頻度(43.9%)に検出された。本属菌は主に植物の根部に棲息するが、ある学術報告では殺菌後のレタス表面から検出されている。本研究における成績は、殺菌工程が野菜表面に付随する細菌の多くを制御することで、白菜内部に侵入・生息していた本属菌の競合的増殖を助長したものと推測される。

(4) *Microcystis* 属

Microcystis 属は、最終製品より最も高頻度(39.8%)に検出された。本属菌は、低温抵抗性を示すことが知られているため、包装後、低温下に保存される最終製品中でも一定数が保持されていると考えられる。

(5) *Escherichia* 及び *Enterobacter* 属

当該菌属の構成比率は、最終製品中でそれぞれ0.04%および0.02%であった。大腸菌群は最終製品から分離培養されていなかったため、本成績は死菌由来核酸のわずかな混入によるものと考えられた。

4. 白菜由来菌叢は塩濃度依存性の変動を示す

Pseudomonas 属菌の構成比率変動と塩漬け込みとの関連性が示唆されたことを受けて、生鮮白菜を原材料として0、2、10%食塩水中で3日間の漬け込み工程を再現し、同工程前後での菌叢及び指標菌数動態を比較することとした。

一般細菌数は食塩濃度に関わりなく、漬込前後で顕著な差異を示さなかったが、大腸菌数は10%食塩水漬込後には、漬け込み前に比べ、有意な菌数低減を示した。菌叢解析を通じて、10%食塩漬込み群では、*Pantoea* 属構成比率が顕著に減少した。上述のパイロットスタディにおいて最も優勢な構成比率を示した *Pseudomonas* 属は、食塩濃度の上昇に伴い、構成比率が高まる傾向を示した。

以上より、食塩濃度は漬込工程における原材料由来の菌叢を左右する重要な決定因子であると共に、同工程は殺菌工程と併せて、浅漬け製造での病原微生物制御に寄与する工程であることが定量的に実証された。

④ 漬物の衛生規範に関する実態調査-真菌調査-

1) 漬物の酵母

供試した105漬物について酵母試験を実施した結果、約60%(60試料)で酵母の検出を確認でき

なかった。残り45試料で酵母の検出を認められた。酵母数をみると10²個/gは15試料、10³個/gは9試料、10⁴個/gは10試料、10⁴個/g以上は11試料であった。

漬物の種類別では、塩漬け、粕漬け、麴漬、酢漬け、ぬか漬けで酵母数が多い傾向にあった。ただし、本研究で入手した漬物の多くは加熱処理されていない未加熱製品である。それらの漬物中の酵母の多くは、*Saccharomyces cerevisiae* であり、漬物のそのものに由来するものと判定した。表6に示したが、7試料において漬物由来とされない種が検出された。

漬物別の酵母検出頻度を図3に示した。酵母は漬物では普遍的にみられるものといえた。

2) 漬物のカビ

105試料の漬物についてカビ試験を実施した。その結果、約70%(75試料)の試料でカビの検出が認められなかった。残り40試料でカビを認めた。カビ数をみると10²個/gは28試料、10³個/gは2試料と少なく、さらに、10⁴個/g以上の試料は検出されなかった。

漬物の種類別では、からし漬けを除いてカビの検出が認められた。漬物中にはカビの検出頻度は非常に少ないことが確認できた。

本研究の主要な課題はカビ数ではなく、どのような種類のカビが検出されたかが、重要因子である。漬物において検出されたカビは、湿性環境に多いカビで代表的なカビの *Fusarium*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Aureobasidium* 等であった。一方、*Aspergillus*, *Eurotium*, *Paecilomyces* 等のように乾性環境に多いカビも確認された。

また、保存料の有無、および食塩濃度も示したが、保存料の有無にかかわらずカビの検出がみられた。さらにカビが検出された試料では、比較的食塩濃度は低値であった。

3) 漬物の食塩濃度

入手した一部の漬物製品の漬物汁について、食塩濃度を測定したところ、試料の多くは1%以下の低塩値を示した。

4) 加熱処理した漬物での事故事例

本研究では市販漬物中にどの程度の酵母、およびカビが検出されるかについて定量試験を実施した。一方、加熱処理した漬物でカビ事故事例が起こった事例も経験した。この事例は、A県とB県の2件で起きた。いずれも地場産業として積極的に販売促進している食品であったが、賞味期限内でカビの発生がみられた。カビの特定を行ったところ、いずれも耐熱性カビ *Neosartorya fischeri* であった。

2. 寄生虫による汚染に関する研究

1) 食品汚染・症例に関する文献・実態調査臨床症例数

(i) 症例数

文献学的検索で明らかとなった国内感染の土壌媒介寄生虫症例は、1990年から2015年までの26年間に回虫が225例、鞭虫が23例、鉤虫は8例であった。2011年以降の5年間でも、回虫が5例、鞭虫が7例、鉤虫は2例と、土壌媒介寄生虫によ

る症例は発生が続いた。BMLの資料から明らかとなった土壌媒介寄生虫症は、2000年から2015年までの16年間に回虫が272例、鞭虫が283例、鉤虫は215例であった。2011年以降の5年間でも、回虫が34例、鞭虫が45例、鉤虫は9例と、最近も症例の発生が継続し、しかも文献検索による解析結果と比べて症例数は多かった（BMLの資料は国内感染だけでなく輸入症例も含む、また日本人だけでなく外国人の症例も含む）。

(ii) 感染源

文献学的検索で抽出された土壌媒介寄生虫症例256例中、感染源が生野菜の症例は11例、無農薬野菜は14例、有機野菜は7例で、残りは感染源を明らかにすることができなかった。内訳を見ると、生野菜を感染源とする回虫症例は9例、鞭虫症例は2例であり、無農薬野菜を感染源とする回虫症例は14例、有機野菜を感染源とする回虫症例は5例、鞭虫症例および鉤虫症例は各々1例であった。無農薬野菜を感染源とした回虫症例が最も多かった。感染源となった具体的な野菜の種類も特定を試みたが、具体的な野菜名の記述がないか、あるいは野菜の種別、例えば根菜類との記載のみで、汚染野菜の種類の特定は困難であった。

(iii) 検査機関における検査データの解析

目黒寄生虫館は1990年～2008年の19年間に、合計2,657検体の検査・鑑定依頼を受託していた。このうち非動物性食品が175検体（5.9%）、また動物性食品は1,820検体（68.5%）、人体・動物および環境由来は662検体（24.9%）であった。非動物性食品に関する検査・鑑定依頼の件数は最も少なかったが、この中で最も件数の多い検体は、野菜・果実等で83検体（非動物性食品の47.4%）であり、次いで海藻の44検体（25.1%）、更に穀類・いも・豆の32検体（18.3%）の順であった。これらの食品のうち、人体への感染性を持つ寄生虫が検出された検体数は11件で、非動物性食品の検体のうち6.3%を占めるに過ぎなかった。また検出された寄生虫は総てアニサキスであった。その内訳をみると、*Anisakis*属線虫が検出された検体は、米飯、マーガリン、粉末調味料で、各1検体ずつであった。一方、*Pseudoterranova*属線虫が検出された検体は、豆腐（2検体）の他、米飯、パン、ほうれん草、キムチ、白滝、ワカメで各1検体であった。さらに、食品媒介寄生虫の「虫卵」を目的に検査依頼された検体として、キムチ14検体、乾燥ネギ1検体を認めたが、これらは総て寄生虫卵陰性であった。

16の検査機関のうち1機関を除く15機関と目黒寄生虫館において2005年度および2006年度の検査数は、計79件および11件であったが、2007年度から2010年度までは、いずれの検査機関においても検査は実施されていなかった。また2011年度以降2015年度までは、年間に計1件から9件の検査が実施されていた。なお虫卵が検出されたのは、2005年度に実施された1件のみであった。

2) 検査方法に関する検討

検査指針および2005年度厚労科研「輸入食品の寄生虫汚染制御に関する緊急研究」総括・分担報告書も引用文献として採用した。これらの文献資料を一覧すると、食品汚染の寄生虫卵を検出するプロセ

スは、汚染食品からの虫卵の分離回収操作と、回収虫卵の検出操作の2つから構築されていた。まず、野菜・果物や漬物・キムチ等の汚染食品から虫卵を分離回収するという操作については、いずれも水あるいは界面活性剤等を用いてサンプルの表面をブラシなどで洗う、振り洗いする、超音波を利用するなどの手法がとられていた。しかし中には、単に水で洗うという記述のみのももあり、洗浄プロセスについての詳細な記述と更に比較考察をした成績はなかった。一方、洗浄液については村田らがその組成について比較検討を行い、界面活性剤と消泡剤の併用が回収率の向上に寄与することを示した。

次いで、食品から分離回収した溶液中の虫卵の検出法については、虫卵を比重液に浮遊させて顕微鏡下に観察する浮遊法、あるいは虫卵をより効率的に沈査に集めて顕微鏡下に観察する沈殿法、のいずれかの手法が採用されていた。笛木らは、野菜や土壌の検査では回収沈渣の量が多いため、浮遊法でより効率よく検査ができるとした。また、村田は野菜・果実、有機肥料、栽培土壌及び砂場などの寄生虫卵検査法として浮遊法を採用し、更にキムチの検査法でも浮遊法を採用した。検査指針でも浮遊法が採用されている。一方で、海外の報告では、Klapecが浮遊法を採用していた他は、おおむね沈殿法が用いられていた。浮遊法と沈殿法との比較検討は、キムチおよび犬の糞便を検体としたものがあり、キムチの検査法では沈殿法の検出感度が高いと結論されていた⁷⁾。一方で犬の糞便については、沈殿法の検出感度が高いとする論文と、浮遊法の検出感度が高いとする論文の両方を認めた。

予備試験の結果、1回の試験に用いる検体重量は、ストマッカー法および超音波法ともに50g、洗浄液量は250mlとし、虫卵の検出操作は沈殿法を用いることとした。また超音波法では、処理時間を5分、洗浄容器の洗浄回数は2回とした。このような条件で、本試験を実施したところ、以下の結果が得られた。

(i) 接種回虫卵数を1,000個とした場合

回収虫卵数は、超音波法では 1129.6 ± 104.7 （平均±標準偏差）、従来法では 861.2 ± 264.4 、ストマッカー法では 1485.6 ± 398.6 であった。ストマッカー法による回収虫卵数の平均値が、従来法のそれより有意に高い（有意水準5%）との結果を得た。他のデータ間には、有意差を認めなかった。

(ii) 接種回虫卵数を200個とした場合

回収虫卵数は、超音波法では 133.0 ± 19.4 、従来法では 133.4 ± 34.6 、ストマッカー法では 154.6 ± 48.2 であった。各データ間には、有意差を認めなかった。

3) 輸入キムチ・行者ニンニクでの汚染実態調査

いずれの輸入キムチ検体からも、人体寄生性の寄生虫卵は検出されなかった。なお、キムチ検体#4（韓国産）からは、浮遊時間0.5時間でダニの卵が検出された。また、行者ニンニク41検体について寄生虫卵検査を実施したが、いずれの検体も陰性で、エキノコックスの虫卵は全く検出されなかった。

3. 容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス菌

対策に係る情報収集と食品内挙動に関する研究

1) ボツリヌス菌の食品内動態試験

(a) ボツリヌス菌芽胞液の添加回収試験

a-1) クロストリジウム属菌および一般細菌の食品内動態

試験開始時の A 型菌および B 型菌芽胞添加量は、検体 1 g あたりそれぞれ 418 ± 213 cfu および $1,093 \pm 329$ cfu であった。検体食品内のクロストリジウム属菌の動態は、A 型 B 型いずれの菌型においても保存温度に関係なく、6 ヶ月目まで添加時と同程度の菌数を維持した。その後、減少傾向に転じたが、1 年後にも接種菌は検出された。6 ヶ月目以降の菌数の減少は、 4°C 保存群より保存温度が高い群 (25°C および 30°C 保存群) においてより顕著となる傾向が認められた。試験開始時の一般細菌数 (生菌数) は、A 型菌芽胞添加群、B 型菌芽胞添加群、芽胞非添加群でそれぞれ、 406 ± 213 cfu/g、 396 ± 374 cfu/g、 246 ± 136 cfu/g であった。 4°C 保存群の生菌数は芽胞菌添加の有無に関わらず 1 年を通じて開始時とほぼ同等であったが、 25°C および 30°C 保存群では、検体間での差異はみられるものの、初期菌数からは増加傾向にあった。

a-2) 理化学的性状の経時的変化

保存試験開始時の食品 pH 値は 5.15 ± 0.11 であった。pH 値は保存温度に関係なく、保存期間を通じて概ね 5~5.5 程度の範囲にあった。酸化還元電位は、試験開始時点で 32.02 ± 7.0 mV で、 4°C および 30°C 条件下ともに、一旦上昇傾向になったがその後下降し、試験終了時 (1 年後) には開始時点より低い値となった。一般的に、ボツリヌス菌の生育可能な酸化還元電位は -200 mV 程度であると報告されているが、我々は平成 26 年度の検討結果から -200 mV から $+200$ mV までの広い範囲でボツリヌス菌が良好に発育することを明らかにしており、酸化還元電位についても、当該検体はボツリヌス菌の生育が可能な理化学的性状を有すると考えられた。

(b) ボツリヌス菌栄養型菌液の添加試験

芽胞菌を用いた試験 (a) では、検体食品内でボツリヌス菌が長期間維持されているものの、菌の顕著な増殖はみられなかった。そこで、栄養型菌液の添加を行い、「たくあん」製品内でボツリヌス菌の増殖について確認試験を行った。試験開始時の A 型および B 型栄養型菌添加量は、それぞれ 277 ± 41 cfu/g、 419 ± 61 cfu/g であった。60 日間の保存期間中、検体の容器包装に膨張等の変化は見られず、60 日後に保存を終了し菌数の測定を行ったところ、A 型菌添加 4°C 保存群で 151 ± 45 cfu/g、A 型菌添加 30°C 保存群で 71 ± 10 cfu/g、B 型菌添加 4°C 保存群で 157 ± 40 cfu/g、B 型菌添加 30°C 保存群で 95 ± 21 cfu/g で、いずれの菌型、保存温度においても減少傾向にあり、栄養型菌についても、当該食品検体内で発育・増殖を示さないことが明らかとなった。

(c) ボツリヌス菌芽胞液の添加試験 2-栄養素添加

ボツリヌス菌等は発育・増殖に高タンパク質および高炭水化物を必要とする。今回の対象検体の原材料は大根という、窒素源および炭素源が非常に乏し

いマトリックスであることから、本菌が当該食品内で発育・増殖しなかった一因として、窒素源及び炭素源の不足が考えられた。そこで、当該検体に芽胞液と共に、20 倍濃縮の BHI broth を添加し、ボツリヌス菌の動態を検討した。BHI broth 非添加 A 型芽胞液添加群、BHI broth 添加 A 型芽胞液添加群、BHI broth 非添加 B 型芽胞液添加群、BHI broth 添加 B 型芽胞液添加群における試験開始時のクロストリジウム属菌は、それぞれ 382 ± 40 cfu/g、 512 ± 112 cfu/g、 308 ± 3 cfu/g、 607 ± 436 cfu/g であった。30 日間の保存期間後のクロストリジウム属菌数は、A 型 B 型いずれの菌型、また保存温度においても、保存試験開始時よりも減少傾向にあり、BHI broth 添加条件下でもボツリヌス菌の増殖は見られなかった。同じ検体および芽胞菌非添加検体での生菌数は、いずれの群も保存試験開始時より若干の増加傾向が見られ、一部例外もあるものの、BHI broth を添加した 30°C 保存群にその傾向が強かった。

2) ボツリヌス菌の増殖に係る理化学的性状に関する検討

計 9 供試株では、酸素濃度 0.75% 以下で培養 1 日以内に良好な増殖を示し、うち 407-1 を除く 8 株は 1.00% でも同 4 日以内に増殖を呈した。一方、CB21 株については、0.50% 以下での増殖を示すにとどまった。また、生存性については、より高い酸素濃度下においても、ヒートショックを行った後には確認された。

3) ボツリヌス毒素の *in vitro* 定量的検出法の探索 (マウス毒性試験法との比較検討)

蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) を利用した迅速・高感度のボツリヌス毒素 *in vitro* 検出法「BoTest™ Botulinum Neurotoxin Detection Kit」が米国 BioSentinel 社によって開発され、国際的な妥当性確認を行う準備段階にある。本試験では、この「BoTest™ Botulinum Neurotoxin Detection Kit」と現在の国際的な標準法であるマウス毒性試験法 (*in vivo* 法) を用い、検出感度の比較検討を行った。A 型毒素を用いた場合、マウス毒性試験法での検出最低濃度は 6-10 pM であった。一方、BioSentinel 社の A 型毒素用キットを用いた試験では、陰性対照と有意差があった最低濃度は 10 pM と動物試験法と同等の成績を示した。また、B 型毒素に対するマウス毒性試験法での検出最低濃度は 30-100 pM であったのに対し、B 型毒素用キット (BoTest™ B/D/F/G Botulinum Neurotoxin Detection Kit) で陰性対照と有意差があった最低濃度は 10 nM と、検出感度の課題が残される結果となった。

4. 国外における非動物性食品の病原微生物汚染の実態とその対策に関する調査

25 年度：国外における食中毒発生動向・食品汚染に関する情報収集

1. 食品の回収・汚染情報にもとづくリスク分析

1-1. 米国での非動物性食品の回収情報

米国 FDA が発表した 2004~2013 年の回収情報は合計で約 3,300 件であった。これには食品だけで

なく医薬品や医療機器等の回収情報も含まれている。このうち非動物性食品と分類されるものは約400件であった。米国FDAや以下に記載するカナダCFIAの回収情報の集計件数には、同一事例にかかわる関連回収情報や追加回収情報等が含まれている可能性があるため、件数のみで評価しないよう注意が必要である。

米国FDAの非動物性食品関連の回収情報における対象食品は生鮮野菜が最多となっており(120件)、次いでナッツ類(98件)、生鮮果物(59件)、コショウ・唐辛子等のスパイス(32件)、ゴマ(11件)が多く報告されていた(表1)。生鮮野菜・果物では、具体的にはサラダ、スプラウト、ホウレンソウ、レタス、トマト、カンタロープ、マンゴーが多く報告されていた。

回収の原因病原体として多かったのはサルモネラ(276件)、リステリア(95件)、大腸菌O157:H7(17件)、ボツリヌス(13件)であった。他にも赤痢菌、大腸菌O145、A型肝炎ウイルス、腸チフス菌が報告されていた。

回収食品と原因病原体の組み合わせとしては、2004~2013年の10年間で、ナッツ類、スプラウト、コショウ・唐辛子類、カンタロープ、トマト、ゴマ、ホウレンソウではサルモネラとの組み合わせが最も多く、サラダ、レタスではリステリアとの組み合わせが多く見られた。ホウレンソウ、サラダ、レタスでは大腸菌O157:H7との組み合わせも比較的多く報告されており、ザクロはすべてがA型肝炎ウイルスとの組み合わせであった(表2)。

1-2. カナダでの非動物性食品の回収情報

CFIAがとりまとめた2004~2013年の食品回収情報は合計で約1,400件であった。このうち非動物性食品に分類されるものは約300件であった。CFIAの回収情報における対象食品はナッツ類が最も多く(87件)、生鮮野菜(72件)、ゴマ(37件)、生鮮果物(31件)、コショウ・唐辛子・カレー粉等(23件)が多く報告されていた(表3)。生鮮野菜・果物では、具体的にはサラダ、バジル、スプラウト、ホウレンソウ、レタス、カンタロープ、マンゴーが多く報告されていた。

回収の原因病原体として多かったのはサルモネラ(241件)、リステリア(32件)、ボツリヌス(15件)、大腸菌O157:H7(11件)であった。他にも赤痢菌、A型肝炎ウイルス、クリプトスポリジウム、サイクロスポラが報告されていた。

回収食品と原因病原体の組み合わせでは、2004~2013年の10年間で、ナッツ類、ゴマ、スプラウト、コショウ・唐辛子類、バジル、マンゴー、カンタロープ、カルダモンではサルモネラとの組み合わせが最も多く、サラダ、マッシュルーム、タマネギ、リーキ(西洋ネギ)ではリステリアとの組み合わせが多く見られた。ナッツ類、レタス、ホウレンソウでは大腸菌O157:H7との組み合わせも比較的多く報告されており、赤痢菌はニンジンとの組み合わせのみが報告されていた。A型肝炎ウイルスはベリーと、クリプトスポリジウムはパセリと、サイクロスポラはバジルとの組み合わせのみが報告されていた(表4)。

1-3. EUでの非動物性食品の病原微生物汚染情報

EUでの病原微生物汚染情報に関しては参考文献1のTable 30に、2001~2011年に非動物性食品に関連してRASFFに通知があった汚染等の件数が、いくつかの病原微生物ごとに記載されている(表5)。

サルモネラの全通知件数は692件で全体の77%を占め、そのうち「その他のハーブおよびスパイス」が184件、「その他の農産物の混合製品」が111件、「ゴマ種子」が80件、「その他の種子およびナッツ」が73件であった。

大腸菌(病原性および非病原性の両方を含む)は全59件で、そのうち「バジル」が16件、「その他のハーブおよびスパイス」が12件であった。

バチルスは全58件で、そのうち「その他のハーブおよびスパイス」が20件、キノコが13件であった。他にもベリー類ではノロウイルスと、バジル、コリアンダー、ペパーミント、黒コショウではサルモネラとの組み合わせが多く報告されていた。

2. アウトブレイク情報にもとづくリスク分析

2-1. 米国のサルモネラアウトブレイク

2006~2011年のFDOSSのデータから、原因食品が非動物性であると思われるサルモネラアウトブレイクを抽出した。各年(1~12月)について抽出されたアウトブレイクの件数を表6に示す。各年とも110~150件のサルモネラアウトブレイクの報告があり、そのうち非動物性食品によると思われるものは各年15~21件であった。

抽出された非動物性食品によるサルモネラアウトブレイクのリストを表7に示す。アウトブレイクごとに、発生年、サルモネラ血清型、患者数、入院患者数、死亡者数、原因食品、汚染原材料(判明した場合)が示されている。

表7のアウトブレイクを、原因食品の原材料がどの品目グループ(commodity group)に分類されるかに従ってグループわけした。ここで用いた原材料の品目グループはPainterら(参考文献2)により2009年に提唱されたものである。Painterらは、食品原材料を17の品目グループに分類した。分類はヒエラルヒー構造をとっており、本研究で対象とする非動物性食品は「植物性」の原材料のみを含むものである。Painterらは植物性の原材料を8つの品目グループに分類している。すなわち、穀類・豆類(1)、油脂・砂糖(2)、果物・ナッツ(3)、キノコ類(4)、葉物野菜(5)、根菜(6)、発芽野菜(7)、および、つる性・茎野菜(8)である(カッコ内の番号は本研究で便宜的につけたもの)。以上のうち3~8は農産物、4~8は野菜類と総称される。1~8のそれぞれの品目グループに含まれる品目の代表例が表8に示されている。

表7のアウトブレイクを原因食品の原材料の品目グループ別に従い分類した。原因食品が特定の1つの品目グループの原材料のみを含んでいる場合、アウトブレイクはその品目グループに分類し、2つ以上の品目グループの原材料を含んでいる場合はグループ9(複合食品)に分類した。

各品目グループに分類されたアウトブレイクの

件数は、グループ1が3件、3が23件、5が7件、6が5件、7が15件、8が19件、および9が30件で、グループ2および4に分類されたアウトブレイクはなかった。品目グループごとに、そのグループに分類されたアウトブレイクの件数、合計患者数、合計入院患者数、合計死者数を示した(表9)。表9より明らかなように、件数、患者数とも、果物・ナッツを原材料として含む食品を原因とするアウトブレイクが最も多く、次いで、つる性・茎野菜、発芽野菜であった。果物・ナッツおよびつる性・茎野菜の両グループのアウトブレイクを合わせると、件数では全体(特定の1つの植物性品目グループを原因食品とするアウトブレイクのすべて)の58%、患者数では81%、入院患者数では89%を占め、死者では100%に関連していた。

次に、品目グループではなく個々の品目のレベルで、どの品目がより多くサルモネラアウトブレイクに関連していたかを調べた。品目グループ1は関連するアウトブレイクの件数および患者数が少なかったため対象にしなかった。結果を表10に示す。各品目グループで、関連したアウトブレイクの件数が多かった品目のみを示している。関連したアウトブレイクの件数でみると、果物・ナッツの品目グループではスイカ(4件)とカンタロープメロン(4件)が最も多くアウトブレイクと関連しており、次いでピーナッツ製品(3件)であった。関連した患者数ではピーナッツ製品が最も多かった(1,529人)。葉物野菜ではレタス(4件)、根菜ではポテトサラダ(4件)が最も多く関連しており、発芽野菜ではアルファルファスプラウトが9件で最も多く、次いで豆もやし(3件)であった。つる性・茎野菜ではトマト(12件)が最も多く関連し、ついでペッパー(5件)であったが、患者数ではペッパーが最も多くの患者(1,654人)の原因食品となっていた。

以上より、非動物性原材料としては、トマト、アルファルファスプラウト、ペッパーが最も多く2006~2011年の米国のサルモネラアウトブレイクに関連していたことがわかった。患者数に関してはペッパーおよびピーナッツ製品が最も多くのアウトブレイク患者の発生に関連していた。

2-2. 米国の志賀毒素産生性大腸菌(STEC) O157 アウトブレイク

2006~2011年のFDOSSのデータから、原因食品が非動物性であると思われるSTEC O157およびSTEC non-O157アウトブレイクを抽出した。各年(1~12月)について抽出された件数を表11に示す。

原因食品が非動物性であると思われるSTEC non-O157アウトブレイクは件数が5件と少なかったため以後の分析は行わなかった。抽出されたSTEC O157アウトブレイク28件のリストを表12に示す。

サルモネラアウトブレイクの場合と同様、表12に示したSTEC O157アウトブレイクを原因食品の品目グループにもとづき分類した。その結果、グループ3(果物・ナッツ)に5件、グループ5(葉物野菜)に14件、グループ6(根菜)に1件、ダ

ループ9(複合)に8件のアウトブレイクが分類され、グループ1、2、4、7、および8に分類されたアウトブレイクはなかった。品目グループごとに、そのグループに分類されたアウトブレイクの件数、合計患者数、合計入院患者数、合計死者数を示したのが表13である。この表より、STEC O157によるアウトブレイクに関連した植物性品目グループとしては葉物野菜が圧倒的に多く、件数で全体の70%、患者数で93%を占め、次いで果物・ナッツ(25%と6.1%)であった。

葉物野菜、果物・ナッツ、および根菜に分類されるいかなる品目が原因食品として、より多くSTEC O157アウトブレイクに関連していたかを調査した。結果を表14に示す。

以上より、非動物性原材料としてはレタスが圧倒的に多く2006~2011年の米国のSTEC O157アウトブレイクに関連していた。患者数に関してもレタス、次いでハウレンソウが最も多くのアウトブレイク患者の発生に関連していた。

2-3. 欧州のサルモネラアウトブレイク

EFSA報告書(参考文献1)のTable 26には、EU諸国等(スペインを除くEU加盟26カ国、ノルウェー、スイス)から2007~2011年に報告された非動物性食品を原因食品とするアウトブレイクの概要(原因食品の品目カテゴリー、品目、病因物質、血清型、発生年、発生国、エビデンスのレベル、患者数、入院患者数、死者数)が記載されている。EUでは食品由来アウトブレイクは2005年から報告が義務化されている。本研究では、欧州のアウトブレイクデータに関して、サルモネラ、ペロ毒素産生性大腸菌(VTEC)、およびセレウス菌を病因物質とするアウトブレイクを対象とした。

Table 26からサルモネラアウトブレイク事例を抽出した。Table 26には原因食品が非動物性である219件の食品由来アウトブレイク(合計患者数10,543人)が記載されており、このうち細菌が病因物質であるアウトブレイクは141件、サルモネラが病因物質のアウトブレイクは37件(合計患者数1,340人)であった。ちなみに同期間に動物性食品を原因食品とするアウトブレイクは合計で2,065件(患者数30,230人)が報告されていた(このうちサルモネラアウトブレイクは1,271件、17,001人)。

37件のサルモネラアウトブレイクのうち32件のリストを表15に示す。37件のうち5件は原因食品の記載に具体性がほとんどなかったためこの表に含めなかった。表15で使用されている原因食品の品目カテゴリーは、参考文献1において提唱されている分類法(表16)に従っている。

表15のアウトブレイクを品目カテゴリーごとにとまとめ、合計のアウトブレイク件数、患者数を示したのが表17である。件数の多い品目カテゴリー順に記載している。

件数の最も多い品目カテゴリーは発芽野菜(11件)で、次いで葉物野菜(7件)であった。これら2カテゴリーのアウトブレイクをあわせると、件数で全体の56%、患者数で76%を占めていた。

次に品目カテゴリーではなく品目レベルで、どの